



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

REC'D 22 OCT 2004

WIPO

PCT

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 08 OCT. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

BEST AVAILABLE COPY



26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

N° Indigo 0 825 83 85 87

0,15 € TTC/mm

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

Réservé à l'INPI

re dépôt

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

cerfa
N° 11354*03

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE page 1/2

BR1

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

03 540 @ W / 030103

REMISE DES PIÈCES

DATE

8 JUIL 2003

LIEU

75 INPI PARIS

N° D'ENREGISTREMENT

0308332

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE

0 8 JUIL. 2003

PAR L'INPI

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

Cabinet REGIMBEAU
20, rue de Chazelles
75847 PARIS CEDEX 17
FRANCE

Vos références pour ce dossier

(facultatif) 240686 D21313 NT

Confirmation d'un dépôt par télécopie

☐ N° attribué par l'INPI à la télécopie

2 NATURE DE LA DEMANDE

Cochez l'une des 4 cases suivantes

Demande de brevet

☒

Demande de certificat d'utilité

☐

Demande divisionnaire

☐

Demande de brevet initiale

N°

Date

ou demande de certificat d'utilité initiale

N°

Date

Transformation d'une demande de
brevet européen *Demande de brevet initiale*

☐

N°

Date

3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

Composite injectable pour magnétocytolyse de cellules métastatiques osseuses

4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ
OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE
LA DATE DE DÉPÔT D'UNE
DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

☐ S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)

☒ Personne morale

☐ Personne physique

Nom

ou dénomination sociale

URODELIA

Prénoms

Forme juridique

N° SIREN

SOCIETE ANONYME

Code APE-NAF

448058701

Domicile

Rue

Lieudit Le Gaillard Route de Saint Thomas 31470 SAIGUEDE

ou
siège

Code postal et ville

Pays

FRANCE

Française

N° de télécopie (facultatif)

Nationalité

N° de téléphone (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

☐ S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

Remplir impérativement la 2^{ème} page

Réservé à l'INPI

REMISE DES PIÈCES

DATE

8 JUIL 2003

LIEU

75 INPI PARIS

N° D'ENREGISTREMENT

0308332

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DB 540 W / 030103

6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)		240686 NT
Nom		
Prénom		
Cabinet ou Société		Cabinet REGIMBEAU
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		
Adresse	Rue	20, rue de Chazelles
	Code postal et ville	75847 PARIS CEDEX 17
	Pays	
N° de téléphone (facultatif)		01 44 29 35 00
N° de télécopie (facultatif)		01 44 29 35 99
Adresse électronique (facultatif)		info@regimbeau.fr
7 INVENTEUR (S)		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG <input type="text"/>
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS		<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences
Le support électronique de données est joint		<input type="checkbox"/>
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input type="checkbox"/>
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI L. MARIELLO

- 5 La présente invention se rapporte à un matériau dégradable biocompatible composé d'une matrice phosphocalcique comprenant des particules magnétiques, ledit matériau étant utile pour le traitement des métastases osseuses par thermolyse et/ou pour le traçage des cellules cancéreuses.
- 10 Les métastases osseuses de cancers primaires situés ailleurs dans l'organisme sont très fréquentes, elles sont même une évolution attendue de la maladie au fur et à mesure que l'espérance de vie des patients augmente. Le tissu osseux est une des trois localisations les plus fréquentes des métastases cancéreuses. Elles sont particulièrement fréquentes dans l'histoire naturelle des cancers du sein, de la prostate,
- 15 du poumon, du rein et de la thyroïde. Elles constituent, radiologiquement dans la majorité des cas, une lacune en raison de la forte activité ostéolytique qui se manifeste dans leur périphérie. Cette ostéolyse s'accompagne cliniquement de douleurs osseuses et de fractures d'os longs ou tassements de corps vertébraux. Le pronostic des métastases osseuses reste très sombre et leur traitement est palliatif. Des survies
- 20 prolongées peuvent néanmoins être obtenues en fonction des caractéristiques de la tumeur primaire.

Histologiquement, les métastases sont classées en tumeurs ostéolytiques, ostéoblastiques mixtes et de type intertrabéculaires. Le type le plus fréquent est le type

25 mixte dans lequel une zone de résorption osseuse coexiste avec une zone de régénération en périphérie de la première. Les métastases sont constituées d'amas cellulaires entre les trabécules ou les restes de trabécules. Au niveau cellulaire, il existe un grand polymorphisme et de nombreuses cellules atypiques avec de nombreuses images de mitoses. Elles sont entourées de tissu osseux montrant de nombreux signes

de résorption sous la forme de nombreuses lacunes de Howship avec des ostéoclastes actifs.

Les cellules constituant ces amas cellulaires proviennent de la migration de cellules de la tumeur primaire qui se fixent dans le tissu osseux car elles trouvent des conditions favorables à leur développement. Les métastases osseuses peuvent être également classées en différents stades de développement : phase d'apparition, phase d'interaction, et phase carcinomateuse. Elles sont le plus souvent diagnostiquées pendant la phase d'interaction c'est-à-dire lorsque les cellules tumorales activent la formation et l'activité d'ostéoclastes qui sont les cellules chargées de la résorption osseuses. Il semble que les cellules tumorales collaborent avec les cellules stromales et les ostéoblastes pour le recrutement d'ostéoclastes à travers le système RANK-RANKL (Kitazawa, S., et Kitazawa, R., RANK ligand is a prerequisite for cancer-associated osteolytic lesions, J Pathol, 2002 : 198 ; 228-236).

L'objectif de l'invention est le traitement des métastases osseuses. Il permet d'éliminer les cellules cancéreuses pour limiter la progression de la maladie et pour abolir la stimulation des ostéoclastes sans, autant que faire se peut, détruire les capacités de régénération osseuse en périphérie de la tumeur. L'élimination des cellules cancéreuses aboutit cliniquement à une diminution de la douleur et une baisse du risque fracturaire.

Plusieurs types de traitements sont habituellement associés pour réduire le volume tumoral. La radiothérapie externe est habituelle, souvent associée à un traitement chimiothérapique. L'échappement à la chimiothérapie est relativement précoce et les risques hématologiques ainsi que l'inconfort inhérents à la chimiothérapie par voie générale restent un problème majeur de ce type de traitement. La radiothérapie n'est pas dénuée de risque, en particulier, lorsque la métastase est située à proximité d'un organe noble, poumon, système nerveux central... D'autre part, le problème de ces

traitements, lorsqu'ils sont efficaces, provient de l'élimination concomitante des cellules impliquées dans la régénération osseuse.

5 D'autres traitements actifs au niveau de la métastase, peuvent être mis en œuvre à visée antalgique. L'injection intraveineuse d'isotope du strontium ainsi que l'utilisation de biphosphonates s'est révélée efficace. Ces composés ne conduisent pas ou peu à l'élimination des cellules cancéreuses.

Des voies de traitement originales sont actuellement développées afin d'avoir une action plus spécifique sur la cellule cancéreuse. Elles sont destinées à éviter les effets
10 secondaires des chimio et radiothérapies qui entraînent la cytolysé des cellules à prolifération rapide et sont donc toxiques sur les cellules souches sanguines et celles des épithéliums à renouvellement rapide. Elles sont basées sur le principe du transport d'une molécule inactive au contact des cellules tumorales, la molécule étant activée quand elle a atteint la tumeur. La fixation de molécules cytotoxiques sur des particules
15 magnétiques que l'on va injecter par voie intraveineuse et que l'on concentre dans la tumeur grâce à un champ magnétique ou à des molécules organiques spécifiques des récepteurs des cellules tumorales est une méthode qui a suscité de nombreuses recherches (Yanase, M., Shinkai, M., Honda, H., Wakabayashi, T., Yoshida, J., Kobayashi, T., intracellular hyperthermia for cancer using magnetite cationic
20 liposomes : an in vivo study, *Jpn J Cancer Res* ; 89 (4) : 463-9, 1998 ; Moroz, P., Jones, S., Gray, B.N., Magnetically mediated hyperthermia : current status and future directions, *Int J Hyperthermia* ; 18 : 267-84, 2002 ; Pulfer, S.K., Gallo, J.M., Targeting magnetic microsphere to brain tumors, in: Häfeli, U., Schütt, W., Teller, J., Zborowski, M., (eds) *Scientific and clinical applications of magnetic carriers*. Plenum Press New
25 York 1997, pp 445-456). Les particules une fois phagocytées ou internalisées par les cellules peuvent avoir une toxicité propre grâce au principe actif qu'elles véhiculent et qu'elles relarguent dans la cellule. Elles peuvent également être chauffées dans un champ magnétique à haute fréquence et induire une thermolyse directe ou bien indirectement par sensibilisation des cellules chauffées à la radio ou la chimiothérapie.

Les obstacles majeurs à ce type de thérapie proviennent de la spécificité plus ou moins bonne de l'adressage des particules. En fonction de leurs caractéristiques de surface et des protéines plasmatiques se fixant à leur surface, elles vont être ou pas éliminées par phagocytose dans la rate et le foie par des macrophages avant qu'elles ne puissent être activées au contact des cellules cancéreuses (Müller, R.H., Lück, M., Harnisch, S., Thode, K., Intravenously injected particles : surface properties and interaction with blood proteins – The key determining the organ distribution. in: Häfeli, U., Schütt, W., Teller, J., Zborowski, M., (eds) Scientific and clinical applications of magnetic carriers. Plenum Press New York 1997, pp 135-148). Un autre obstacle est lié à la plus ou moins grande spécificité des molécules chargées de la reconnaissance cellulaire ainsi que la possibilité, pour les particules, de passer la barrière vasculaire.

La possibilité d'injecter, directement dans la tumeur, les microparticules en suspension dans un liquide a également été évoquée. Cependant, l'injection est délicate car il est difficile dans ces conditions de savoir où vont les particules. Les particules doivent pouvoir pénétrer dans les tumeurs puis dans les cellules qu'elles doivent détruire. L'efficacité des particules dans la thermocytolyse est liée à leur contact avec les cellules. Les particules non liées aux cellules sont beaucoup moins efficaces (Bacri, J.C., de Fatima Da Silva, M., Perzynski, R., Pons, J.N., Roger, J., Sabolovic, D., Halbreich, A., Use of magnetic nanoparticles for thermolysis of cells in a ferrofluid. . in: Häfeli, U., Schütt, W., Teller, J., Zborowski, M., (eds) Scientific and clinical applications of magnetic carriers. Plenum Press New York 1997, pp 597-606). Les cellules du système des phagocytes mononucléés présentes dans le sang et de nombreux tissus sont capables de phagocyter des particules jusqu'à une taille d'environ une quarantaine de μm . Les autres cellules ont des capacités de phagocytose beaucoup plus limitées. En revanche, quasiment toutes les cellules sont capables d'ingérer par endocytose des particules de taille beaucoup plus réduites. Il est généralement considéré que les particules de taille inférieures à 100 nm sont capables de passer la

membrane cellulaire par endocytose. Il suffit pour cela que les cellules soient au contact des particules.

5 Ainsi, il apparaît nécessaire de trouver des solutions thérapeutiques alternatives pour répondre aux problèmes mentionnés ci-dessus concernant l'utilisation des particules magnétiques en cancérologie.

10 Dans le cadre de l'invention, nous avons développé un système permettant d'injecter dans une tumeur une pâte contenant une suspension minérale à partir de laquelle va précipiter un sulfate ou un phosphate de calcium contenant des particules magnétiques de petites tailles dispersées dans la matrice minérale formée qui vont être libérées au fur et à mesure de la dégradation de celle-ci. Le rôle de la matrice est de contenir les particules dans la zone d'injection, les maintenir séparées les unes des autres et les libérer au contact des cellules tumorales suivant une cinétique définie. Les particules
15 libérées vont ensuite pénétrer dans les cellules tumorales par endocytose.

Plusieurs avantages sont obtenus avec ce matériau : Les matrices de phosphates et de sulfates de calcium présentent une bonne biocompatibilité osseuse. Ils sont, pour la plupart, capables d'être totalement intégrés dans le tissu osseux sans provoquer de
20 réaction à corps étranger importante. Ils sont ensuite dégradés à des vitesses variables suivant leur composition chimique et leurs caractéristiques physico-chimiques et totalement remplacés par le tissu osseux. Ces matrices sont injectés dans l'os sous forme d'une pâte d'où il précipite un composé de phosphate ou de sulfate de calcium différent de celui qui est en suspension dans la pâte. L'intrication des cristaux du
25 précipité assure la prise du matériau et sa tenue mécanique qui peut être proche de celle de l'os spongieux en quelques heures à quelques jours (T. Yuasa, Y. Miyamoto, K. Ishikawa, M. Takechi, M. Nagayama, and K. Suzuki. *In vitro* resorption of three apatite cements with osteoclasts. *J Biomed Mater Res* 54:344-350, 2001; S. Takagi, L. C. Chow, M. Markovic, C. D. Friedman, and P. D. Costantino. Morphological and

- phase characterizations of retrieved calcium phosphate cement implants. *J Biomed Mater Res (Appl Biomater)* 58:36-41, 2001; Y. Miyamoto, T. Toh, T. Yuasa, M. Takechi, Y. Momota, M. Nagayama, K. Ishikawa, and K. Suzuki. Basic properties of apatite cement containing carbonate apatite and its resorption by cultured osteoclasts.
- 5 In: *Proceedings of the 13th Int Symp on Ceramics in Medicine*, Anonymous Switzerland: 2001, p. 829-832.).

Par ailleurs, les particules magnétiques peuvent être chauffées dans un champ électromagnétique avant ou après avoir pénétré dans les cellules. Ce chauffage peut

10 être répété le nombre de fois nécessaires sans nécessiter une autre injection. Les particules magnétiques sont, en effet, libérées sur plusieurs jours à plusieurs semaines à partir de la matrice minérale. Lorsque les cellules sont thermolysées, les particules qu'elles contenaient s'ajoutent à celles qui viennent d'être libérées de la matrice pour être phagocytées par de nouvelles cellules. De plus, ces particules agissant au cœur de

15 la tumeur n'entravent pas la régénération osseuse existant dans la périphérie des métastases osseuses.

Description

20 Ainsi, l'invention se rapporte à un matériau dégradable biocompatible caractérisé en ce qu'il est composé d'une matrice phosphocalcique et/ou de sulfate de calcium ou d'une matrice polymérique biocompatible dégradable, ladite matrice contenant des particules magnétiques, ledit matériau se trouvant sous la forme d'une pâte lors de l'introduction dans l'organisme et sous forme solide ultérieurement. Les particules sont libérées au

25 fur et à mesure de la dégradation du ciment constituant la matrice dans laquelle elles sont emprisonnées.

Par "matrice phosphocalcique", on entend un mélange comprenant un ou plusieurs phosphates sélectionnés parmi le groupe des phosphates de calcium amorphe, des

30 phosphates apatitiques faiblement cristallins, des phosphates dicalciques anhydres ou

dihydratés, des phosphates tricalciques, des phosphates monocalciques monohydratés, des pyrophosphates, des phosphates octocalciques ou de l'hydroxyapatite. De préférence, la matrice phosphocalcique est rapidement résorbable, c'est à dire dans un délai de quelques jours à quelques semaines ce qui implique une solubilité
 5 correspondant à celle du phosphate dicalcique. Ladite matrice peut également être constituée tout ou partie de sulfates de calcium qui présentent des caractéristiques de biocompatibilité et de dégradation également compatibles avec les applications du matériau pour le traitement des tumeurs osseuses.

10 En outre, ledit matériau peut être composé d'une matrice polymérique dégradable contenant des particules magnétiques. Elle peut être constituée par un polymère biodégradable naturel ou artificiel, tels que collagène, acides polylactiques et glycoliques, polydioxanone, polyfumarate, polyanhydres, polyorthoesters, polyurethanes, polyphosphazenes, polycaprolactone, polyhydroxybutyrate,
 15 polyhydroxyvalerate, polyvalerolactone, acide polytartronique et polymalonique. Le matériau peut-être sous forme de gel, de mousse ou de pâte.

Par "particules magnétiques", on entend des particules contenant un métal, notamment du fer, de préférence sous forme de ferrites : magnétite ou maghémite ou tout autre
 20 matériau inorganique ferro, ferri, méta ou antiferromagnétiques. Elles sont constituées de préférence de ferrite (Fe_2O_3) ou de magnétite. Elles peuvent être sous la forme d'un composite organo-minéral. Le minéral magnétique constituant le noyau de la particule est entouré d'une couche d'un composé organique. Les particules métalliques peuvent être obtenues par synthèse hydrothermale dans un réacteur agité en injectant 80 ml
 25 d'une solution de FeCl_2 calculée pour pouvoir synthétiser 5 g de magnétite, on ajoute ensuite 170 cm³ d'eau desaérée contenant 10 gr de NaOH. Sous débit d'azote (30l/h) la solution est portée à 80°C. Lorsque cette température est atteinte, l'azote est remplacé par de l'air comprimé au même débit pendant 20 heures. Les ferrites sont ensuite lavés à l'eau puis à l'éthanol avant d'être séchés.

De préférence, les particules magnétiques ont une granulométrie comprise entre 0,001 μm et 0,01 μm , ou encore entre 0,05 μm et 0,1 μm , par exemple 0,07 μm , 0,15 μm , 0,5 μm . Elles peuvent, cependant, avoir une taille de l'ordre du micron pour des applications particulières, par exemple une granulométrie comprise entre 0,1 et 10 μm .

Un tel matériau forme ainsi une matrice minérale libérant les particules magnétiques suivant une cinétique compatible avec leur internalisation par les cellules des tissus avoisinants. Le matériau de l'invention peut résider en une association à une matrice minérale ou organique de particules magnétiques ou de particules de fer revêtues d'une couche de minéral préférentiellement de phosphate, sulfate ou carbonate de calcium. Ce revêtement peut également contenir un élément fluorescent tel que l'Europium. Plus spécifiquement, lesdites particules sont constituées d'un composite organo-minéral contenant un noyau de fer, de ferrite ou tout autre composé magnétique recouvert de polymère sous forme d'une couche mince ou sous forme de chaînes polymériques présentant un bout libre. Avantageusement, lesdites particules magnétiques sont vectrices d'une molécule utilisée en chimiothérapie ou bien un isotope.

Dans un deuxième aspect, l'invention porte sur un procédé de préparation dudit matériau comprenant le mélange d'une poudre de particules magnétiques à une poudre minérale de phosphate ou un sulfate de calcium en solution aqueuse jusqu'à formation d'une pâte, et en un durcissement de ladite pâte pendant quelques minutes à quelques heures. Ce procédé peut comprendre en outre une étape de préparation desdites particules par synthèse hydrothermale dans un réacteur par injection d'une solution de FeCl_2 dans un réacteur, addition d'eau desaérée contenant du NaOH , le mélange étant mis sous débit d'azote et portée à une température comprise en 50°C et 100°C, remplacement de l'azote par de l'air comprimé jusqu'à l'obtention de ferrites.

Les particules magnétiques une fois à l'intérieur des cellules sont destinées à être chauffées dans un champ magnétique pouvant être produit par exemple par un appareil d'imagerie par résonance magnétique nucléaire ou par tout autre générateur. Ainsi, dans un troisième aspect, l'invention concerne l'utilisation d'un matériau décrit ci-dessus pour la préparation d'un médicament ou d'un dispositif médical destiné au traitement des tumeurs osseuses. Plus particulièrement, ce dispositif médical permet la thermolyse ciblée des cellules cancéreuses. Ceci est rendu possible au moyen des particules magnétiques qui sont capables d'induire une hyperthermie dans les tissus dans lesquels ils sont libérés.

10

Un des avantages de cette méthode de chauffage dans un champ électromagnétique est de pouvoir, une fois l'injection faite, être répétée le nombre de fois nécessaires sans nécessiter une autre injection. Les particules magnétiques sont, en effet, libérées sur plusieurs jours à plusieurs semaines à partir de la matrice phosphocalcique. Lorsque les cellules sont lysées, les particules qu'elles contenaient s'ajoutent à celles qui viennent d'être libérées de la matrice calcique pour être phagocytées par de nouvelles cellules. D'autre part, ces particules agissant au cœur de la tumeur n'entravent pas la régénération osseuse existant dans la périphérie des métastases osseuses.

20 Un autre avantage est de pouvoir être combinée aux autres méthodes de traitement actuellement connues, notamment la radiothérapie et/ou la chimiothérapie.

Dans un quatrième aspect, l'invention porte sur une méthode de diagnostic d'extension des cancers osseux comprenant l'utilisation des particules magnétiques comme traceurs de cellules tumorales détectables en IRM et le suivi des cellules en migration pour pouvoir traiter des sites à des stades infracliniques. Il faut souligner que pour le traçage cellulaire, les particules d'oxyde de fer de taille plus importante ($\sim 0,5 \mu\text{m}$) produisent un signal de plus forte intensité (Hinds, K.A., et al. Highly efficient endosomal

25

labelling of progenitor and stem cells with large magnetic particles allows magnetic resonance imaging of single cells. Blood, 2003).

5 L'invention porte également sur une méthode permettant le traçage en IRM, en microscopie électronique, focale ou de fluorescence des cellules ayant ingérées lesdites particules après relargage à partir d'un matériau dégradable et biocompatible décrit ci-dessus.

Exemple 1 : Caractéristiques des particules magnétiques :

10 Obtention par synthèse hydrothermale

Composition Fe_2O_3

Forme octogonale

Propriétés magnétiques : $H_c = 350 \text{ Oe}$, $\sigma_r = 32 \text{ uem/g}$

Taille 50 à 1500 nm.

15

Exemple 2 : Caractéristiques de la poudre de sulfate de calcium :

Composition $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 96%

$\text{CaCO}_3 \cdot \text{MgCO}_3$: 2, 1%

$\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot \text{Al}_2\text{O}_3$: 0,5%

20 SiO_2 : 0,4%

Taille moyenne des particules : 17 – 20 μm

pH de la solution de gâchage à 10% : 7,6

Solubilité pour 100 ml d'eau : 0,3 g

Surface spécifique : 2,5

25

Exemple 3 : Endocytose des particules magnétiques

1 mg de particules magnétiques précédemment décrites de 0,07 μm de granulométrie a été introduit dans une culture de lignée primaire de cellules métastatiques osseuses afin de vérifier les capacités de ces cellules à phagocyter les particules. La lignée cellulaire

a été obtenue à partir d'une biopsie d'une métastase osseuse d'un adénocarcinome du sein lors d'une intervention pour ostéosynthèse. Les cellules contenues dans la biopsie ont été dissociées par incubation pendant deux heures à 37°C dans une solution de collagénase dans un tampon phosphate isotonique. La suspension cellulaire a ensuite
5 été centrifugée, remise en suspension dans 2 ml de milieu de culture DMEM supplémenté en 5% de sérum de veau fœtal et introduit dans un flacon de culture à une densité de 10^5 cellules/ml. Les cellules ont été cultivées pendant trois jours jusqu'à un stade de pré-confluence. Elles forment alors un tapis laissant un espace entre les cellules dont certaines sont sphériques marquant ainsi une prolifération élevée. 1 mg de
10 poudre est ensuite mis en suspension par agitation dans 1 ml de milieu de culture et 0,5 ml est introduit dans le flacon de culture dans lequel on le dilue par l'apport de 3 ml de milieu de culture. Les cellules ont ensuite incubées à 37°C pendant 48 heures. A l'issue de cette période de culture les cellules sont observées en microscopie optique inversée puis le fond de la boîte est raclé et les cellules recueillies sont déshydratées, incluses
15 dans une résine epoxy. Des coupes de 250 amstrongs sont faites et observées en microscopie électronique à transmission. L'examen en microscopie optique révèle des particules de différentes tailles (agglomérat de particules) à l'intérieur du cytoplasme des cellules. Les coupes en microscopie électronique montrent que le cytoplasme contient de nombreuses vésicules de type lysosomiales remplies de une ou plusieurs
20 particules métalliques. Entre 10 et 30% des surfaces de section des cellules sont occupées par des particules.

Exemple 4 : Test des différentes granulométries

1 mg de particules magnétiques précédemment décrites a été introduit dans une culture
25 de lignée primaire de la même lignée de cellules métastatiques osseuses afin de vérifier les capacités de ces cellules à phagocyter les particules. Les particules ont quatre granulométries différentes : 0,07 μm , 0,15 μm , 0,5 μm . La lignée cellulaire a été obtenue à partir d'une biopsie d'une métastase osseuse d'un adénocarcinome du sein. Les cellules contenues dans la biopsie ont été dissociées par incubation pendant deux

heures à 37°C dans une solution de collagénase dans un tampon phosphate isotonique. La suspension cellulaire a ensuite été centrifugée, remise en suspension dans 2 ml de milieu de culture DMEM supplémenté en 5% de sérum de veau fœtal et introduit dans un flacon de culture à une densité de 10^5 cellules/ml. Les cellules ont été cultivées pendant trois jours jusqu'à un stade de pré-confluence. Elles forment alors un tapis laissant un espace entre les cellules dont certaines sont sphériques marquant ainsi une prolifération élevée. 1 mg de poudre de chaque échantillon est ensuite mis en suspension par agitation dans 1 ml de milieu de culture et 0,5 ml est introduit dans un flacon de culture dans lequel on le dilue par l'apport de 3 ml de milieu de culture. Chaque essai est répété trois fois. Les cellules ont incubées à 37°C pendant 48 heures. Les cultures sont ensuite examinées en microscopie optique inversée et en microscopie électronique par transmission.

Quelle que soit la granulométrie, de nombreuses particules sont en quelques heures au contact des cellules et à la fin du temps d'observation, elles ont pénétré dans les cellules. Comme cela a été rapporté par Hinds (Hinds, K.A., et al. Highly efficient endosomal labelling of progenitor and stem cells with large magnetic particles allows magnetic resonance imaging of single cells. Blood, 2003), l'internalisation des particules n'a pas semblé induire de mort cellulaire lors de la période de culture.

20

Exemple 5 : Dégradation des matrices minérales *in vivo*

Quatre moutons adultes ont été anesthésiés et un trou de 4mm de diamètre et de 5 mm de long a été effectué dans le condyle externe droit. Le trou a ensuite été rempli avec une pâte constituée de sulfate de calcium qui a été laissé prendre *in situ*. Deux moutons ont été euthanasiés à deux semaines et les deux autres à quatre semaines. Les condyles ont été prélevés, déshydratés dans de l'éthanol et inclus dans des blocs de polyméthyl méthacrylate. Des coupes de 7 μ m d'épaisseur ont été effectuées, colorées par une solution de Giemsa et observées en microscopie optique. A deux semaines, le plâtre injecté est toujours visible. Il est en voie de résorption, avec des encoches dans la

25

matrice minérale. L'implant est entouré de tissu conjonctif lâche avec en périphérie immédiate de l'implant des monocytes et des cellules géantes. Il existe des signes d'ostéogénèse au niveau des trabécules osseux dans lequel le plâtre est implanté. Des fragments de matériaux sont visibles, et les cellules au contact du matériau selon
 5 l'invention contiennent des grains de minéral. A quatre semaines, l'implant a disparu. Il reste dans la zone d'implantation, une zone de tissu conjonctif lâche qui est beaucoup plus petite que la section de l'implant. Un tissu osseux immature poreux a pénétré dans la zone d'implantation. Il existe encore quelques fragments d'implants et les cellules macrophagiques contiennent encore quelques grains de matériau. Il n'existe aucun
 10 signe d'ostéolyse.

Exemple 6 : Délivrance des particules magnétiques à des cellules par la matrice *in vivo*

Quatre moutons adultes ont été anesthésiés et un trou de 4mm de diamètre et de 5 mm
 15 de long du condyle externe droit a été effectué. Le trou a ensuite été rempli avec une pâte constituée de plâtre de Paris contenant 2 mg de particules magnétiques par ml de solution de gâchage. Deux moutons ont été euthanasiés à deux semaines et les deux autres à quatre semaines. Les condyles ont été prélevés, déshydratés dans de l'éthanol et inclus dans des blocs de polyméthyl méthacrylate. Des coupes de 7 μ m d'épaisseur
 20 ont été effectuées, colorées par une solution de Giemsa et observées en microscopie optique. A deux semaines, il existe un début de résorption du matériau qui est entouré d'un tissu conjonctif lâche. Les cellules macrophagiques au contact du matériau contiennent des particules minérales biréfringentes ainsi que des particules magnétiques noires qui réalisent un tatouage du cytoplasme. Il faut noter que des
 25 cellules conjonctives qui n'ont pas les caractéristiques morphologiques de macrophages montrent également un cytoplasme tatoué. A un mois, l'implant a disparu et une grande partie de la surface de section occupée au préalable par l'implant est envahi par des trabécules osseux. L'espace intertrabéculaire est occupé par un tissu conjonctif lâche dont toutes les cellules sont tatouées par les particules magnétiques.

L'étude en microscopie à transmission confirme que de nombreuses cellules autour de l'implant contiennent des particules métalliques.

REVENDECATIONS

- 5 1. Matériau composite dégradable biocompatible, caractérisé en ce qu'il est composé d'une matrice phosphocalcique et/ou de sulfate de calcium ou d'une matrice polymérique biocompatible dégradable, ladite matrice contenant des particules magnétiques, ledit matériau se trouvant sous la forme d'une pâte lors de l'introduction dans l'organisme et sous forme solide ultérieurement.
- 10 2. Matériau composite selon la revendication 1, caractérisé en ce que le phosphate de calcium est un mélange comprenant un phosphate sélectionné parmi le groupe des phosphates de calcium amorphe, des phosphates apatitiques faiblement cristallins, des phosphates dicalciques anhydres ou dihydratés, des phosphates tricalciques, des
- 15 phosphates monocalciques monohydratés, des pyrophosphates, des phosphates octocalciques ou de l'hydroxyapatite.
3. Matériau selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que ledit phosphate de calcium forme une matrice phosphocalcique rapidement résorbable.
- 20 4. Matériau selon l'une des revendications 1 à 3, comprenant en outre du sulfate de calcium
- 25 5. Matériau selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce qu'il est composé d'une matrice polymérique biocompatible dégradable comprenant un polymère choisi parmi le collagène, les acides polylactiques et glycoliques, le polydioxanone, le polyfumarate, les polyanhydres, les polyorthoesters, les polyurethanes, les polyphosphazenes, le polycaprolactone, le polyhydroxybutyrate, le

polyhydroxyvalerate, la polyvalerolactone, l'acide polytartrique et polymalonique; contenant des particules magnétiques.

5 6. Matériau selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que ladite matrice présente des caractéristiques de biocompatibilité et de dégradation compatibles avec les applications du matériau pour le traitement des tumeurs osseuses.

10 7. Matériau selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que les particules magnétiques contiennent un métal, notamment du fer, de préférence sous forme de ferrites : magnétite ou maghémite ou tout autre matériau inorganique ferro, ferri, méta ou antiferromagnétiques.

15 8. Matériau selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que lesdites particules sont constituées d'un composite organo-minéral contenant un noyau de fer, de ferrite ou tout autre composé magnétique recouvert de polymère sous forme d'une couche mince ou sous forme de chaînes polymériques présentant un bout libre

20 9. Matériau selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que les dites particules magnétiques sont vectrices d'une molécule utilisée en chimiothérapie ou bien un isotope.

10 Matériau selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que lesdites particules ont une granulométrie comprise entre 0,001 et 0,1 μm .

25 11 Matériau selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que lesdites particules ont une granulométrie comprise entre 0,1 et 10 μm

12. Matériau selon l'une des revendications 1 à 11 formant une matrice minérale libérant les particules magnétiques suivant une cinétique compatible avec leur internalisation par les cellules des tissus avoisinants.
- 5 13. Matériau selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce qu'il comprend des particules revêtues d'une couche de phosphate de calcium contenant un élément fluorescent tel que l'Europium.
- 10 14. Procédé de préparation d'un matériau selon l'une des revendications 1 à 10 comprenant le mélange d'une poudre de particule magnétique à une poudre minérale de phosphate ou de sulfate de calcium-en solution aqueuse jusqu'à formation d'une pâte, et en un durcissement de ladite pâte pendant quelques minutes à quelques heures.
- 15 15. Procédé de préparation d'un matériau selon la revendication 10 comprenant en outre une étape de préparation desdites particules par synthèse hydrothermale dans un réacteur par injection d'une solution de FeCl_2 dans un réacteur, addition d'eau desaérée contenant du NaOH , le mélange étant mis sous débit d'azote et porté à une température comprise en 50°C et 100°C , remplacement de l'azote par de l'air comprimé jusqu'à l'obtention de ferrites.
- 20 16. Méthode de diagnostic des cancers osseux comprenant l'utilisation des particules magnétiques contenues dans un matériau selon l'une des revendications 1 à 13 comme traceurs de cellules tumorales détectables en IRM et le suivi des cellules en migration pour pouvoir traiter des sites à des stades infracliniques.
- 25 17. Méthode pour le traçage des cellules ayant ingéré lesdites particules après relargage à partir d'un matériau dégradable et biocompatible selon l'une des revendications 1 à 13 au moyen d'IRM, microscopie électronique, microscopie confocale ou microscopie en fluorescence.

12. Matériau selon l'une des revendications 1 à 11 formant une matrice minérale libérant les particules magnétiques suivant une cinétique compatible avec leur internalisation par les cellules des tissus avoisinants.
- 5 13. Matériau selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce qu'il comprend des particules revêtues d'une couche de phosphate de calcium contenant un élément fluorescent tel que l'Europium.
- 10 14. Procédé de préparation d'un matériau selon l'une des revendications 1 à 10 comprenant le mélange d'une poudre de particule magnétique à une poudre minérale de phosphate ou de sulfate de calcium-en solution aqueuse jusqu'à formation d'une pâte, et en un durcissement de ladite pâte pendant quelques minutes à quelques heures.
- 15 15. Procédé de préparation d'un matériau selon la revendication 10 comprenant en outre une étape de préparation desdites particules par synthèse hydrothermale dans un réacteur par injection d'une solution de FeCl_2 dans un réacteur, addition d'eau desaérée contenant du NaOH , le mélange étant mis sous débit d'azote et porté à une température comprise en 50°C et 100°C , remplacement de l'azote par de l'air comprimé jusqu'à l'obtention de ferrites.
- 20 16. Utilisation d'un matériau selon l'une des revendications 1 à 13 pour la préparation d'un dispositif pour le diagnostic des cancers osseux comprenant l'utilisation des particules magnétiques contenues dans ledit matériau comme traceurs de cellules tumorales détectables en IRM et le suivi des cellules en migration pour pouvoir traiter
- 25 des sites à des stades infracliniques.
17. Utilisation d'un matériau selon l'une des revendications 1 à 13 pour la préparation d'un dispositif pour le traçage des cellules ayant ingéré les particules après relargage à

18. Utilisation d'un matériau selon l'une des revendications 1 à 10 pour la préparation d'un médicament ou un dispositif médical destiné au traitement des tumeurs osseuses.
- 5 19. Utilisation selon la revendication 18 pour la thermolyse ciblée des cellules cancéreuses. Ceci est rendu possible au moyen des particules magnétiques qui sont capables d'induire une hyperthermie dans les tissus dans lesquels ils sont libérés par chauffage des particules dans un champ magnétique.
- 10 20. Utilisation selon la revendication 19 caractérisé en ce que les particules magnétiques une fois à l'intérieur des cellules sont destinées à être chauffées dans un champ magnétique pouvant être produit par un appareil d'imagerie par résonance magnétique nucléaire ou par tout autre générateur.
- 15 21. Utilisation selon l'une des revendications 18 à 20 combinée avec la radiothérapie et/ou la chimiothérapie.

partir dudit matériau dégradable et biocompatible au moyen d'IRM, microscopie électronique, microscopie confocale ou microscopie en fluorescence.

5 18. Utilisation d'un matériau selon l'une des revendications 1 à 10 pour la préparation d'un médicament ou un dispositif médical destiné au traitement des tumeurs osseuses.

19. Utilisation selon la revendication 18 pour la thermolyse ciblée des cellules cancéreuses.

10 20. Utilisation selon la revendication 19 caractérisé en ce que les particules magnétiques une fois à l'intérieur des cellules sont destinées à être chauffées dans un champ magnétique pouvant être produit par un appareil d'imagerie par résonance magnétique nucléaire ou par tout autre générateur.

15 21. Utilisation selon l'une des revendications 18 à 20 combinée avec la radiothérapie et/ou la chimiothérapie.

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

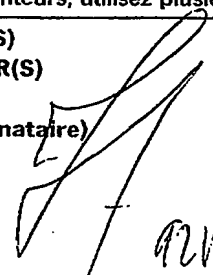
DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.../1...

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 113 W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)		240686 NT	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0308332	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
Composite injectable pour magnétocytolyse de cellules métastatiques osseuses			
LE(S) DEMANDEUR(S) :			
URODELIA : Lieudit Le Gaillard Route de Saint Thomas 31470 SAIGUEDE - FRANCE			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :			
1 Nom		FRAYSSINET Patrick Pierre	
Prénoms			
Adresse	Rue	Lieu dit Le Gaillard Route de Saint-Thomas	
	Code postal et ville	31470 SAIGUEDE FR	
Société d'appartenance (facultatif)			
2 Nom		ROUQUET Nicole, Francine	
Prénoms			
Adresse	Rue	15, rue Auguste Comte	
	Code postal et ville	31400 TOULOUSE FR	
Société d'appartenance (facultatif)			
3 Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)			
 08.07.2003 421753			

PCT/FR2004/001766



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.